

論文 (Original article)

酵素反応とビーズミルを用いた湿式粉碎による食素材への適用を目指した タケからのセルロースナノファイバー製造

下川 知子^{1)*}、池田 努¹⁾、眞柄 謙吾²⁾、戸川 英二¹⁾、中村 雅哉¹⁾、大塚 祐一郎¹⁾、
野尻 昌信¹⁾、高尾 哲也³⁾、小川 睦美³⁾、中山 榮子³⁾、林 徳子¹⁾

要旨

タケ資源から、食素材への適用を目指したセルロースナノファイバーを製造する技術開発を行った。ソーダ蒸解法によって調製したタケパルプをアスペルギルス由来の酵素製剤で前処理することによって、続くビーズミルでの解繊を円滑に行うことが可能となった。解繊に用いるジルコニアビーズの直径と粉碎容器内での速度および処理時間は、得られるセルロースナノファイバースラリーの特性に影響を与えた。ナノ化の進行程度は粒度分布分析によって把握し、透過型電子顕微鏡観察で確認した。得られたセルロースナノファイバー懸濁液の形態観察、粒度分布分析、フィルム強度および摩擦特性から、タケ由来セルロースナノファイバーを製造する方法として、食品添加物として認められたアスペルギルス由来酵素製剤を使用したパルプの前処理と、直径1 mmのジルコニアビーズを用いたナノ化処理を採用することとした。得られたタケセルロースナノファイバーのマウスを用いた急性経口毒性試験では、致死量の中央値 (LD₅₀) が 2,000 mg/kg よりも高いことを確認した。

キーワード：セルロースナノファイバー、タケ、パルプ、セルラーゼ、湿式粉碎、食素材

1. はじめに

セルロースを主成分とする、木材から得られる木材繊維 (パルプ) を微細な繊維状態にまで解繊したセルロースナノファイバー (CNF) は、森林資源由来の新素材として注目されており、様々な製法で製造された CNF が身近な製品へ利用されるようになってきている (矢野 2018, Isogai 2015, Future Markets 2019)。湿式粉碎での CNF 製造時にエンドグルカナナーゼ (EG) の性質を利用した酵素処理を併用する有効性は Henriksson et al. (2007) や 林 (2012) によって報告されており、CNF の環境に優しい製造方法として注目されている。CNF は高い増粘性を有し、ゲル化する特性を持つため、食品へ添加する増粘剤としての利用や、食品テクスチャーの改善、たとえば口当たりを滑らかにする等の用途が考えられている (神野 2015a, b)。セルロースは食物繊維として様々な食品に含まれており、食品添加物としても利用されていることから、食経験を有し、安全性に問題はないと考える。しかし、セルロースをナノレベルにまで解繊した CNF には食経験の蓄積が不足しているために、ヨーロッパ等ではその安全性の確認が強く求められている (EFSA 2011, Bouwmeester et al. 2014)。

タケは生育の早い資源であり、CNF としての利用検討も幅広く行われている (近藤 2016, Chang F et al. 2012)。

モウソウチクにはタケノコとしての食経験があることから、モウソウチクから得られるパルプを原料とした CNF は、将来的な食用を検討するのに適した素材と思われる。タケから得られたパルプを原料に、EG 処理と機械処理の併用によって CNF を製造可能であることは、林ら (2015) によって明らかにされているが、タケ CNF の各種物性、安全性確認のためには、キログラム単位のスケールアップが可能な製造方法の確立が必要であった。また、その CNF 製造プロセスは、モウソウチクのように中山間地において蓄積する資源を原料として利用することを想定した場合、中小規模でも対応可能であり、簡便かつ安全性の高い製造プロセスであることも必要と考えられた。ソーダ蒸解法は樹種を選ばず、中小規模でも対応可能なパルプ化方法である。蒸解助剤としてアントラキノン添加するソーダ・アントラキノン蒸解法もあるが、食品添加物リストに含まれる薬剤ではないことから、高い安全性を確保するためにアントラキノンを使用しないソーダ蒸解を行うこととした。ナノ化プロセスでは、食品添加物として指定されている酵素製剤を使用し、スケールアップが容易で食品製造に使用されているビーズミルを用いた粉碎方法を導入した。構築したプロセスによって製造したタケ由来 CNF の安全性確認試験として、急性経口毒性試験を実施した。

原稿受付：令和2年5月29日 原稿受理：令和2年8月24日

1) 森林総合研究所 森林資源化学研究領域

2) 森林総合研究所 研究ディレクター

3) 昭和女子大学 大学院生活機構研究科

* 森林総合研究所 森林資源化学研究領域 〒305-8687 茨城県つくば市松の里 1

2. 実験方法

2.1 タケチップからのパルプ調製と分析

茨城県牛久市の竹林より2014年11月に採取したモウソウチク (*Phyllostachys edulis*) を1か月程度室内で常温乾燥し、節を除いた部分を繊維方向に細かく割り、約5cm × 3cm × 0.5cmのタケチップを調製した。

タケチップ300g (絶乾重量換算、DM (dry matter)) を2L容オートクレーブ (日東オートクレーブ、NAC13) に入れ、対チップあたり26%の水酸化ナトリウムを含む蒸解液900mlを加え、90分間で155℃まで昇温し、120分間蒸解した。蒸解終了後、300メッシュのスクリーンで黒液を分離し、ディスインテグレーター (熊谷理機、No.2530) で60秒解繊し、フラットスクリーン (熊谷理機、No.2625、8/1000インチ幅スリット) で精選・洗浄した。洗浄パルプは遠心分離機で脱水し、濃度約30%とした。

ソーダ蒸解したタケパルプ100gを2L三角フラスコに取り、水を加えて全量を1Lとした。これを攪拌しながら70℃に加熱し、6gの亜塩素酸ナトリウムと1mlの酢酸を加えて二酸化塩素を発生させ、60分間漂白した。漂白後のパルプはブフナーロートを用いて1A3ろ紙上で水洗し、吸引脱水した。この、二酸化塩素漂白して調製したパルプを二酸化塩素漂白パルプとする。

アルカリ蒸解後に酸素・オゾン・次亜塩素酸塩漂白を行った方法は以下のとおりであり、オゾン漂白パルプと表記する。アルカリ蒸解後のタケパルプ用いて、対パルプあたり4%のNaOHを含む10% (w/v) のスラリーを調製し、中濃度パルプミキサー (Quantum, Mk.5) に入れ、1.01MPaの圧力で上蓋を密閉し、5分毎に600rpmで30秒間攪拌しながら90℃まで昇温した。昇温終了後、0.6MPaの圧力で酸素ガスを導入すると同時に1600rpmで30秒間パルプスラリーを攪拌し、酸素ガスと混合した。その後、酸素圧力を0.6MPaに保ちながら5分毎に600rpmで30秒間攪拌し60分間酸素漂白した。漂白終了後、パルプは中性になるまで300メッシュスクリーン上で洗浄し遠心分離機で脱水した。

リン酸でpH3に調整した120g (DM) のタケ酸素漂白パルプを含む10% (w/v) スラリーを中濃度ミキサーのミキシングボウルに入れ、1.01MPaの圧力で上蓋を密閉し、常温でオゾンを注入して実施した。オゾンは、酸素からオゾン発生器 (PCI, GL-1型) を使用して発生させた。まず、シリンダーに貯留したオゾンを0.8MPaの圧力でミキシングボウル内に圧入し、同時パルプを1600rpmで20秒間攪拌し、続いて600rpmで30秒間攪拌した。その10秒後、ミキシングボウル内の圧力を開放し、この操作を対パルプあたりのオゾン添加量が2%に達するまで繰り返した。漂白後、パルプは300メッシュスクリーン上で中性になるまで水洗し、遠心分離機で脱水した。オゾン漂白終了後のタケパルプは、対パルプあたり1%のNaOHを含む10% (w/v) のタケパルプスラリーとし、ポリエチレンバックに密閉して湯浴中40℃で90分間抽

出後、300メッシュスクリーン上で中性になるまで水洗した。この、1%アルカリ処理後のタケパルプ30g (DM) あたり、4N水酸化ナトリウム水溶液500μl、次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (純正化学) 4.98ml (有効塩素約0.6g相当)、および水を加えて10wt%のスラリーを調製し、ポリエチレンバックに密閉して湯浴中45℃で90分間加熱して漂白した。漂白終了後、パルプは300メッシュスクリーン上で中性になるまで水洗し、脱水した。

漂白処理後のタケパルプの成分分析は、農林水産省・安全局長の定める飼料分析基準に基づき、粗タンパク質はケルダール法、粗繊維はろ過法、粗灰分は直接灰化法での処理を行って湿重量100gあたりの含有量を求めた。漂白したタケパルプの糖組成は、硫酸加水分解後の糖液をCarboPac PA1 (DIONEX) カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーによって分析した (下川ら2013)。

2.2 酵素前処理

酵素製剤は、XL531 (食品添加物、アスペルギルス由来、長瀬産業株式会社) 又はAccellerase 1500 (food grade、トリコデルマ由来、Dupont Industrial Biosciences, Genencor International) を使用した。酵素製剤に含まれるタンパク質は、bovine gamma globulinをスタンダードとしたクイックスタートBradford (BioRad) により定量した。酵素前処理は、タケパルプの濃度をイオン交換水で1wt%とし、パルプ乾燥重量1gあたりのタンパク質が1mgとなるように酵素製剤を添加して45℃で6時間行った。反応後、100℃で10分間の熱処理により酵素を失活させて反応を停止した。

2.3 ビーズミルによる粉碎処理

酵素前処理後のパルプ懸濁液 (1wt%) を、循環型のビーズミル (LMZ015もしくはLMZ10、アシザワ・ファインテック株式会社) で粉碎処理した。ビーズの充填率を85%、流量を0.2L/min (LMZ015)、ビーズの周速を10m/secに設定し、直径1mmもしくは0.5mmのジルコニアビーズを使用した。LMZ015での処理は、500gのパルプ懸濁液を投入する際のビーズ速度を8m/secに設定し、全量投入後に10m/secへ上昇させ、処理時間の測定を開始した。粉碎の程度は、粒度分布分析 (LA-950, Horiba) による粒子径の変化によって逐次把握した。LMZ015でのデータをもとに、50kgの酵素反応懸濁液を用いたLMZ10でのスケールアップ製造を行った。

2.4 調製したタケ由来CNFの性状分析

調製したCNFの形態は、光学顕微鏡及び透過型電子顕微鏡 (TEM, JEM-2000EX, JEOL) により観察した。

CNFフィルムの強度試験は、二酸化塩素漂白パルプを、XL531及びAccellerase 1500で処理し、φ1mmのジルコニアビーズで60分間粉碎処理したCNFを使用した。フィルム作製にあたっては、CNFの濃度を0.24wt%に調製

した懸濁液を使用した。ポリスチレン製のシャーレ上で CNF が 1 mg/cm^2 となるようにスラリーを展開し、室温乾燥させてフィルムを作成した。10 × 40 mm の試験片を切り出し、EZ-Graph (Shimadzu) によって引張強度と破断強度を測定した。

CNF の滑らかさを判定するための摩擦荷重は、クリープメーター (RHEONER II, 山電) によって測定した。二酸化塩素漂白パルプを使用し、XL531 で前処理後、 ϕ 1 mm のジルコニアビーズを用いて LMZ015 により 30 分間および 60 分間ナノ化処理した CNF スラリー 50 μl を人工皮革であるサプラレ (出光テクノファイン) 上、スタート地点から 10 mm の位置に滴下し、摩擦荷重の低減度 (何も滴下しない状態の摩擦荷重 (N) から、サンプル滴下した摩擦荷重 (N) を減じた値) を計測した。プランジャー (幅 10 mm × 奥行 20 mm) にもサプラレを張り付け、垂直荷重 0.1 N、全摺動距離 80 mm で測定し、試料ごとにサプラレを交換した。

2.5 急性経口毒性試験

急性経口毒性試験はマウスを用いて、OECD TG420 (2001) に準拠した試験を日本食品分析センターで実施した。オゾン漂白パルプから、LMZ10 により ϕ 1 mm のジルコニアビーズを用いて製造した CNF を 70℃ で濃縮し、5 wt% としてからオートクレーブで殺菌処理して使用した。注射用水で希釈し、50-2000 mg/kg の投与用量となるように調製した各検体を、約 1 週間予備飼育した 5 週齢の ICR 系雌雄マウスに胃ゾンデを用いて強制経口投与し、14 日間の観察期間ののちに剖検をおこなった。各群につき雌雄それぞれ 5 匹を用いた。以上の実験は、「国立研究開発法人森林総合研究所における動物実験などの実施に関する指針」を順守して実施した。

3. 結果

3.1 タケパルプの調製と成分分析

ソーダ蒸解後、二酸化塩素及びオゾン漂白等で調製したタケパルプの成分分析結果を Table 1. に示す。どちらの漂白方法で製造したパルプも、粗タンパク質、粗脂肪、粗灰分は 0.5 % 以下であり、乾燥重量の殆どを粗繊維が占めた。酸加水分解後のタケパルプの糖組成は、二酸化塩素漂白を行ったもので、アラビノース：ガラクトース：グルコース：キシロース：マンノース = 4.5 : 0 : 65.7

: 29.8 : 0 (mol%) であり、オゾン漂白を行ったもので、2.0 : 0 : 68.5 : 29.5 : 0 (mol%) となり、両者に大きな違いは認められず、多糖としての重量 % では、セルロースを含むグルカンが 70-73% となった。

3.2 酵素による前処理とビーズミルによる粉碎処理

各種安全性試験等を実施するためには、乾燥重量としてキログラム単位の CNF を安定した品質で製造する方法を確立する必要がある。そのため、ナノ化に使用する機械として、食品製造に実績があり、スケールアップが容易で品質管理のしやすい循環型のビーズミルを選択した。酵素処理を実施しないパルプでは、ビーズミル運転中に細い管内でパルプが詰まることによる圧力上昇を主因としたトラブルが多発し、懸濁液の送液速度及びビーズ速度の細かな調整等を要したことから、一貫した条件で製造することは困難であった。酵素処理により、圧力上昇による作業の中断を生じることがなくなり、これらの処理条件を設定可能となった。

3.3 処理条件の選定

タケパルプを XL531 で前処理し、ビーズミルで湿式粉碎したサンプルの粒度分布分析結果を Fig. 1 に示す。500 g のパルプ懸濁液を ϕ 1 mm のビーズで 30 分間処理した状態では、モード径 (最頻径) が 72.22 μm であり、Dv 90 (体積単位の頻度の累積が 90% になる粒子径) は 146.8 μm となった (Fig. 1a)。CNF は粒子状の物体ではないため、粒度分布分析の値は作業の進行状態を把握するための目安として用いており、実際の繊維の幅や長さとは同一ではない。60 分間で粉碎処理を継続した結果、モード径が 21.33 μm へ移行した。この時の Dv90 は、150.15 μm であった (Fig. 1b)。 ϕ 0.5 mm のビーズで 60 分間粉碎処理を行ったサンプルでは (Fig. 1c)、Dv90 は 115.30 μm と ϕ 1 mm の場合より小さい値を示したが、モード径は 72.60 μm で ϕ 1 mm のビーズを用いて 30 分間粉碎した際のモード径と近い値を示した。これらの結果から判断して、 ϕ 1 mm のビーズを使用して粉碎処理を行うこととした。粉碎処理したサンプルにナノ化した繊維が含まれることは、TEM による形態観察で確認した。Fig. 2 は、 ϕ 1 mm のビーズで粉碎した CNF (XL531 使用) を TEM で観察したものである。ナノサイズに解繊した繊維の存在が観察されたが、タケのセルロースの基本単位であるセルロースミ

Table 1. タケパルプの成分

Proximate composition of bamboo pulps.

Bamboo pulps	Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude fiber	Ash
ClO ₂ bleached	71.5	< 0.1	0.2	22.8	< 0.1
O ₃ bleached	75.6	< 0.1	0.2	19.1	< 0.1

Note: Values are averages of two calculations in g/100 g raw weight basis.

クロフィブリルまで解繊維しているのではなく、3-数百 nm 幅のミクロフィブリルの束になり、束が部分的に解繊維されて蜘蛛の巣状に広がった構造も観察された。

食品添加物レベルの酵素製剤である、XL531 及び Accellerase 1500 それぞれを使用して、前処理した CNF からフィルムを作成しその強度比較を行った。60 分間粉碎処理した CNF スラリーを用いて作成したフィルムの引張強度の平均値は、XL531 及び Accellerase 1500 でそれぞれ 83.91 MPa (n=3)、46.88 MPa (n=2) であり、破断歪みはそれぞれ 3.40%、1.83% と、どちらも XL531 で前処理を行った方が高い傾向を示した。

Fig. 3 は、クリープメーターにより ϕ 1 mm のビーズで 30 分間及び 60 分間処理した CNF サンプル (XL531 使用) の滑らかさを測定し、水の場合と比較したものである。

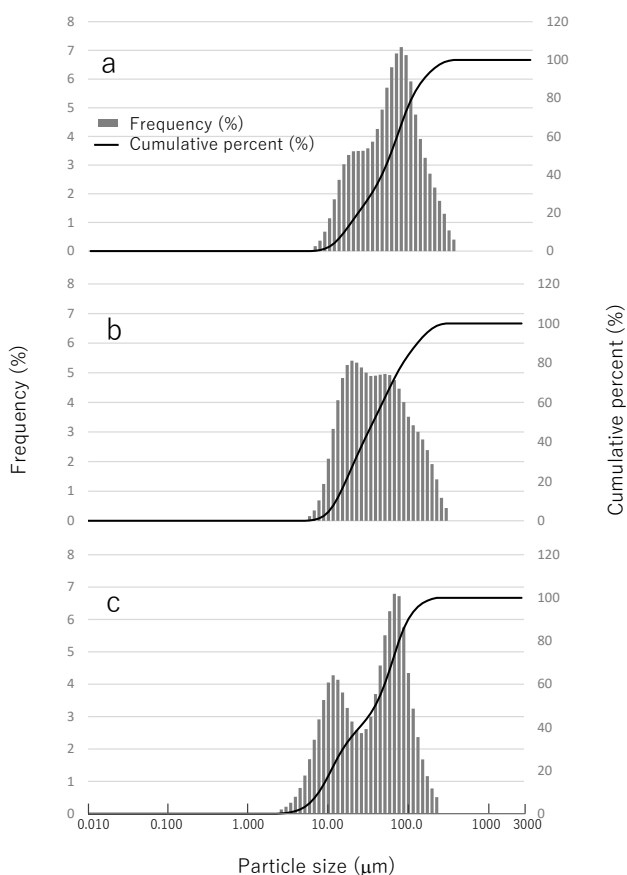


Fig. 1. 粉碎処理した二酸化塩素漂白タケパルプの粒度分布分析

Particle size distribution analysis of pulverized bamboo pulps bleached with ClO_2 .

アスペルギルス由来酵素製剤 XL531 で処理したタケパルプを直径 1 mm のビーズで 30 分 (a)、60 分 (b)、直径 0.5 mm のビーズで 60 分処理 (c)

Bamboo pulps pretreated with the *Aspergillus*-derived cellulase preparation XL531 were pulverized by milling process using 1-mm diameter beads for 30 min (a) and 60 min (b), and 0.5-mm diameter beads for 60 min (c).

クリームを塗る際の滑らかさを試験した実験系 (山電技術資料) を参考に測定を行った。30 分間よりも、60 分間粉碎処理した方が摩擦荷重の低減度が大きく、滑らかであることが示された。

以上の結果から判断して、食用途を検討する際には、アスペルギルス由来のセルラーゼ製剤 XL531 による前処理を行い、 ϕ 1 mm のジルコニアビーズを用いて 500 g のパルプ懸濁液当たり 60 分間に相当する粉碎処理を行うこ

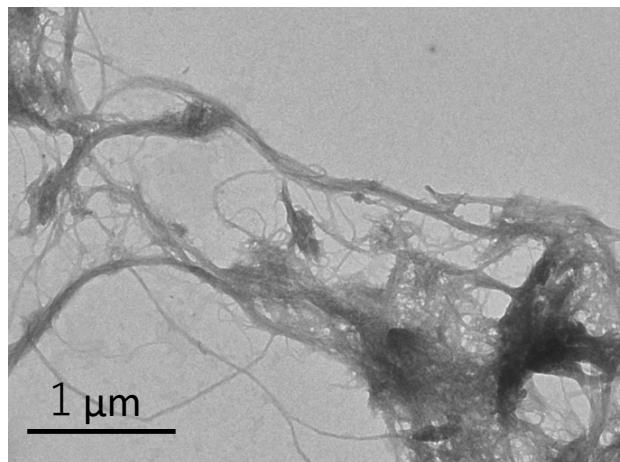


Fig. 2. アスペルギルス由来酵素製剤 XL531 及び直径 1 mm のビーズを用いて調製した微細化タケパルプの透過型電子顕微鏡観察図

Electron micrograph of microfibrillated bamboo pulp pretreated with the *Aspergillus*-derived cellulase preparation XL-531 using 1-mm diameter beads.

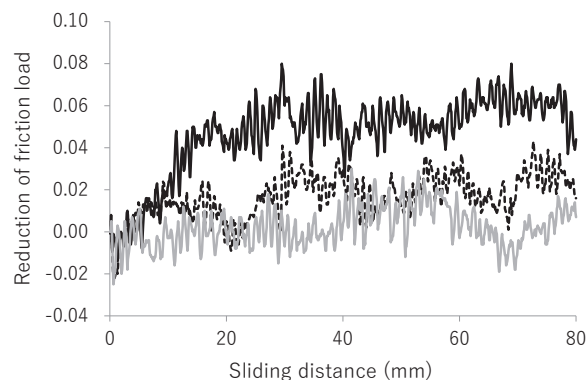


Fig. 3. 人工皮革上での摩擦に対するタケ CNF の影響

Effect of bamboo CNFs on friction load on artificial leather.

ビーズミルで 30 分 (点線)、60 分 (黒線) 処理で調製したタケ CNF と水 (灰色線) を人工皮革上に滴下し、摩擦荷重の低減を測定した

Bamboo CNF suspensions pulverized with bead mill for 30 min (dot line), 60 min (black line), and water (gray line) were dropped on artificial leather, and the reduction in friction load was measured.

ととした。

急性経口毒性試験を実施するための試料は、オゾン漂白パルプを使用した。また、パルプ繊維の解繊状態を均一化させる目的で、運転開始後の処理スラリーを循環タンクへ戻さず、別容器へ回収する1パス処理を採用することとした。LMZ015にて、オゾン漂白パルプを二酸化塩素漂白パルプと同じ条件で酵素前処理し、1パスの外部取り出し工程を組み込んだ粉碎試験を実施した。1パス後10分では、Dv90は130.86 μm であったものの、モード径が72.28 μm であった。Fig. 1cと同じように、モード径が低粒子側に移動したのは30分間の粉碎処理後であり、Dv90が93.34 μm 、モード径16.18 μm であった。作業初期に、パルプ詰まりによる運転停止への対処を行う必要があったが、スケールアップすることで配管が太くなり、問題の解消が図れると考えられた。

以上のLMZ015での実験データを元に、スケールアップ製造では粒度分布分析によってメジアン系が低粒子側へ移動し、かつDv90が100 μm 程度となることを目安に粉碎処理を行うこととした。上記条件を定めることで、同品質のCNF懸濁液を製造可能と判断したためである。粉碎を行うビーズミルはLMZ10を使用し、50 kgの酵素反応パルプ懸濁液を作製した(1 wt%)。LMZ10によって1パス後に80分間処理を行ったところ、メジアン径25.40 μm 、Dv90 108.67 μm の回収品を得た(Fig. 4)。

3.4 急性経口毒性試験

タケCNFを強制経口投与した結果、雌雄いずれの投与群においても観察期間中に死亡例は認められず、マウスの一般状態、体重値に差はみられなかった(Table 2.)。

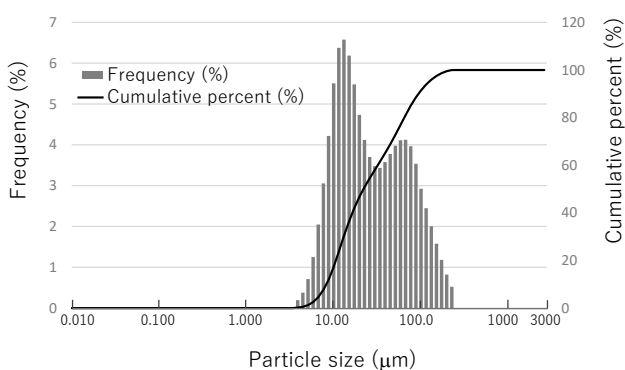


Fig. 4. 粉碎処理したオゾン漂白タケパルプの粒度分布分析

Particle size distribution analysis of pulverized bamboo pulps bleached by O₃.

50 kgのタケパルプ懸濁液をアスペルギルス由来酵素製剤XL531で処理し、LMZ10を用いて1パス後80分処理

Bamboo pulp suspension (50 kg) pretreated with the *Aspergillus*-derived cellulase preparation XL531 was pulverized by LMZ10 for 80 min after 1-pass process.

観察期間終了時の剖検においても異常は認められなかったことから、実験条件において、検体のLD50値は、含有するCNFに換算して雌雄ともに2,000 mg/kgを超えるものと評価された。

4. 考察

身近な資源であるモウソウチクを原料として、地域の産業として食分野での利用を目指したCNFを製造するためには、製紙工場のように大規模な施設ではなく中小規模での対応が可能であり、安全かつ簡便な手法による一貫製造プロセスの構築が必要と考えられた。モウソウチクのチップからパルプを製造し、工業原料であるエタノールへ変換することを目的としたソーダ・アントラキノン蒸解では、155℃で60分間のアルカリ蒸解で十分であったが(下川ら2013)、食品への利用を想定するためにアントラキノン触媒を使用しないソーダ蒸解プロセスとしたために、対チップあたり同じNaOH濃度で120分間の反応が必要となった。また、ソーダ蒸解後の漂白では、二酸化塩素による漂白の他に、食品添加物として使用されるオゾン及び次亜塩素酸ナトリウムを使用した漂白を実施した。オゾンは既存食品添加物であり、次亜塩素酸ナトリウムは食品添加物殺菌料として使用されているため、これらの薬品の適用を検討し、二酸化塩素による漂白と顕著な差の無いことが示された。

ナノ化を行う方法には、ウォータージェット法や砥石を用いた粉碎処理、大型のボールミル、二軸混練等の様々な方法が提案されているが(平田2017)、汎用機械であって取扱い及びスケールアップ対応が容易であり、食品製造の実績があることからビーズミルが適切と考えた。ビー

Table 2. タケCNFの急性経口毒性試験におけるマウスの体重変化
Changes in body weights of mice treated once orally with bamboo CNF.

Sex	Dose (mg/kg)	Days after administration		
		0 ^a	7	14
male	2000	32.5 ± 1.5	36.8 ± 2.8	41.3 ± 3.3
	1000	32.0 ± 1.2	36.3 ± 2.2	37.8 ± 3.8
	300	32.1 ± 2.5	37.3 ± 2.5	41.7 ± 3.6
	50	32.3 ± 1.3	36.4 ± 1.5	40.8 ± 1.3
	0	32.1 ± 1.6	36.6 ± 2.5	41.1 ± 3.4
female	2000	26.6 ± 2.0	29.2 ± 2.3	32.3 ± 3.0
	1000	26.7 ± 2.0	29.5 ± 2.3	33.1 ± 2.9
	300	27.4 ± 1.7	30.2 ± 2.1	33.5 ± 1.7
	50	27.2 ± 1.7	30.6 ± 1.3	33.7 ± 1.8
	0	27.0 ± 1.9	29.7 ± 1.8	33.1 ± 2.0

Note: Values are averages of five animals ± SD (g).

^aBefore administration.

ズの素材として鉄も検討したが、わずかな錆であっても CNF 懸濁液への着色が認められたことからジルコニアを採用した。

CNF 製造のための酵素前処理に使用するセルラーゼは、繊維構造をほぐす EG 酵素活性の強い酵素製剤が適しており、それには繊維の改質等に使用される酵素製剤が該当する。セルロース繊維をほぐす活性の高いセルラーゼとして、ファミリー 45 に属する EG が挙げられる (Shimonaka et al. 2006, Shibuya and Kikuchi 2008)。この EG を単独で発現させた酵素を用いることにより、効果的に CNF を製造可能であるが (渋谷・林 2008)、食品用途には食品製造用の酵素製剤を使用する必要があるため、アスペルギルス由来の酵素製剤とトリコデルマ由来の酵素製剤を比較した。それぞれの酵素前処理を行った CNF より製造したフィルムの強度比較を行った結果、Accellerase 1500 と XL531 で前処理を行った CNF では、後者の酵素を使用した方が高いフィルム強度を示した。繊維長の長い CNF から作製したフィルムの方が高強度を示す傾向が報告されていることから (森本 2015)、XL531 で前処理を行った方が CNF の繊維が長めである可能性が示唆された。原因として、Accellerase 1500 が本来繊維改質に適した酵素製剤ではないために、セルロース繊維をより短く切断してしまったためと考えられる。トリコデルマ由来の酵素は産業利用が活発であり、繊維加工用の酵素製剤や、ファミリー 45 を単独で発現させた EG の試験製造も酵素メーカーで行われている。解繊に優れたトリコデルマ由来の EG が今後、食品添加物レベルで供給されれば、酵素添加量の低減や製造コストの削減に繋がると考えられる。

CNF の安全性を検証し、素材としての特徴を検討していくためには、安定した物性のサンプルを継続して製造する必要があり、そのための判断指標を設定する必要がある。CNF はナノサイズのサンプルであるためにその性質の把握は難しいが、粒度分布分析において $D_v 90$ が $100\ \mu\text{m}$ に達することを製造の目安とすることによって、パルプ製造条件や製造規模の変化に対応してキログラムレベルの CNF を製造可能となった。CNF は工業利用を中心に応用技術開発が行われ、身近な製品への使用が加速している。今後、工業用途だけでなく食品へ添加する用途も可能とすることで、さらに広範な展開が期待できる。ナノサイズのセルロースを、我々は既に、例えばナタデココのように生活に取り入れている (平田 2017)。しかしながら、地域より得られたタケ資源から直接タケパルプを製造し、それをナノ化して利用する場合、このようにして製造されたタケ由来 CNF に食経験があるわけではない。そのため、さらに広範な安全性に関する知見の蓄積によって、タケ CNF の食分野での利用展開が可能になると考える。

謝 辞

本研究の一部は、生物系特定産業技術研究支援センターによる革新的技術創造促進事業「工学との連携による農林水産物由来の物質を用いた高機能性素材等の開発」の一環として実施した。関係各位と酵素製剤を供与頂いた各酵素メーカーへ御礼申し上げる。成分分析は日本食品分析センターで実施した。また、ビーズミルの粉碎試験ではアシザワ・ファインテック株式会社、摩擦荷重測定では山電株式会社の担当の方々にご協力いただいた。ここに記して深く感謝申し上げます。

引用文献

- Bouwmeester, H., Brandhoff, P., Marvin, H. J. P., Weigel, S. and Peters, R. J. B. (2014) State of the safety assessment and current use of nanomaterials in food and food production. *Trend Food Sci. Technol.*, 40, 200-210.
- EFSA Scientific Committee (2011) Scientific opinion on guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. *EFSA Journal*, 9:2140, 36pp.
- Future Markets (2019) Nanocellulose investment and pricing guide. Future Market Inc., 53-195.
- 林 徳子 (2012) 酵素加水分解を用いたセルロースナノファイバーの生産法. *日本ゴム協会誌*, 85, 394-399.
- 林 徳子・下川 知子・渋谷 源・野尻 昌信・真柄 謙吾・池田 努・戸川 英二・久保 智史 (2015) 環境にやさしいセルロースナノファイバー製造技術—叩き潰さずにほぐします—。森林総合研究所平成 27 年版研究成果選集, 34-35pp.
- Henriksson, M., Henriksson, G., Berglund, L. A. and Lindström, T. (2007) An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers. *Eur. Polym. J.* 45, 3434-3441.
- 平田 悟史 (2017) トコトンやさしいナノセルロースの本. ナノセルロースフォーラム編. 日刊工業新聞社, 24-63.
- 神野 和人 (2015a) 増粘剤・ゲル化剤への応用. ナノセルロースフォーラム編, 図解よく分かるナノセルロース, 日刊工業新聞社, 168-169.
- 神野 和人 (2015b) 乳化分散安定剤への応用. ナノセルロースフォーラム編, 図解よく分かるナノセルロース, 日刊工業新聞社, 170-171.
- Isogai, A. (2015) Structural characterization and modifications of surface-oxidized cellulose nanofiber. *J Jap. Petroleum Inst.*, 58, 365-375.
- 近藤 哲男 (2016) ナノセルロースが拓く新しい世界—環境にやさしいバイオ系ナノ材料の特色と応用—. *化学*, 71, 33-38.
- 森本 裕輝 (2015) ウォータージェット解繊によるナノ

- セルロース「BiNF-i-s」. ナノセルロースフォーラム編, 図解よく分かるナノセルロース, 日刊工業新聞社, 104-105.
- 渋谷 源・林 徳子 (2008) セルロースナノファイバーとその製造方法. 特開 2008-150719.
- Shibuya, H. and Kikuchi T. (2008) Purification and characterization of recombinant endoglucanase from the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 72, 1325-1332.
- 下川 知子・池田 努・眞柄 謙吾・品川 早苗・品川 日出夫・野尻 昌信・大原 誠資 (2013) *T. reesei* 及び低胞子性 *A. tubingensis* のカクテル酵素を用いたタケパルプからの同時糖化発酵によるエタノール生産. J. Jpn. Inst. Energy., 92, 970-974.
- Shimokawa, T., Shibuya, H. Ikeda, T., Magara, K., Shinagawa, S., Shinagawa, H., Nojiri, M. and Ohara, S. (2013) Ethanol production from sugi pulp under simultaneous saccharification and fermentation using a cocktail enzyme of *T. reesei* and *A. tubingensis* produced by solid-state fermentation. J. Wood Sci., 59, 171-178.
- Shimonaka, A., Koga, J., Baba, Y., Kishimura, T., Murashima, K., Kubota, H. and Kono T. (2006) Specific characteristics of Family 45 ebdiglucanase from Mucorales in the use of textiles and laundry. Biosci. Biotech. Biochem., 70, 1013-1016.
- 矢野 浩之 (2018) セルロースナノファイバー -- 木の国日本の資源 --. 生存圏研究, 14, 1-7.

Cellulose nanofiber production from bamboo by enzymatic pretreatment for wet milling process using bead mill aiming at application to food materials

Tomoko SHIMOKAWA^{1)*}, Tsutomu IKEDA, Kengo MAGARA²⁾, Eiji TOGAWA¹⁾, Masaya NAKAMURA¹⁾, Yuichiro OTSUKA¹⁾, Masanobu NOJIRI¹⁾, Tetsuya TAKAO³⁾, Mutsumi OGAWA³⁾, Eiko NAKAYAMA³⁾ and Noriko HAYASHI^{1)*}

Abstract

A nano-fibrillation process of bamboo resources to produce cellulose nanofiber was developed for future application to food materials. Bamboo pulp, which was prepared by soda cooking, was assisted by a commercially available cellulase derived from *Aspergillus* to allow smooth performance of the subsequent bead mill pulverization. In the bead milling, the diameter and speed of the zirconia beads in the milling vessel, and grinding time impacted the properties of the resulting microfibrillated pulp slurry. The progress of pulverization was confirmed with particle size distribution analysis, as well as the observation with a transmission electron microscope. Based on the morphology, particle size distribution, film strength, and friction characteristics, the pretreatment using a food additive *Aspergillus*-derived enzyme for pulverization using zirconia beads of 1-mm diameter was verified to provide bamboo cellulose nanofiber. No abnormality was observed on acute oral toxicity test, with an LD₅₀ value of >2,000 mg/kg in mice.

Key words : cellulose nanofiber, bamboo, pulp, cellulase, wet milling, food material

Received 29 May 2020, Accepted 24 August 2020

1) Department of Forest Resource Chemistry, FFPRI

2) Research Director, FFPRI

3) Graduate School of Life Sciences, Showa Woman's University

* Department of Forest Resource Chemistry, FFPRI, 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687 JAPAN E-mail: tsimo@ffpri.affrc.go.jp